

PARTICULES VIRALES CONTENANT UN VECTEUR DERIVE D'ALPHA VIRUS ET PROCEDE DE PREPARATION DE LADITE PARTICULE VIRALE

5 L'invention concerne de nouvelles particules virales contenant un vecteur dérivé d'un alpha-virus rendu défectif pour une propagation autonome et donc pour la réplication. Elle se rapporte également au procédé de préparation desdites particules.

Dans la suite de la description, l'invention est plus particulièrement illustrée en
10 relation avec le virus de la forêt de Semliki (SFV) entrant dans la catégorie des alpha-virus. Bien entendu, cet exemple particulier ne limite en rien la portée de l'invention et tous les alpha-virus peuvent être envisagés, tels que par exemple le virus Sindbis.

Le génome des alpha-virus se présente sous la forme d'un ARN simple brin de
15 polarité positive comprenant deux phases ouvertes de lecture, respectivement une première phase codant les protéines à fonction enzymatique, et une seconde phase codant les protéines structurales. La réplication s'effectue dans le cytoplasme de la cellule. Dans la première étape du cycle infectieux, l'extrémité 5' de l'ARN génomique est traduite en une polyprotéine (nsP 1-4) à activité RNA-polymérase
20 produisant un brin négatif complémentaire de l'ARN génomique. Dans une seconde étape, le brin négatif est utilisé comme matrice pour la production de deux ARN, respectivement :

- un ARN génomique positif correspondant au génome des virus secondaires produisant, par traduction, d'autres protéines nsp et servant de génome aux virus,
- 25 - un ARN sub-génomique codant les protéines de structure du virus formant les particules infectieuses.

Plus précisément, l'ARN sub-génomique est transcrit à partir du promoteur p26S présent au niveau de l'extrémité 3' de la séquence ARN codant la protéine nsp4.
30 Le rapport ARN génomique positif / ARN sub-génomique est régulé par l'autoclavage protéolytique de la polyprotéine en nsp 1, nsp 2, nsp 3 et nsp 4. En pratique,

l'expression des gènes viraux se déroule en deux phases. Dans une première phase, il y a synthèse principale de brins génomiques positifs et de brins négatifs. Pendant la seconde phase, la synthèse d'ARN sub-génomique est quasiment exclusive conduisant ainsi à la production de protéines structurales en très grande quantité.

5

La connaissance du mode de réplication des alpha-viridae et la simplicité de leur génome a conduit à l'émergence de systèmes de transfert de gènes utilisant ces virus, ces derniers permettant d'obtenir une forte expression du transgène dans la cellule cible.

10

L'une des conditions incontournables pour qu'un vecteur dérivé d'alpha-virus puisse être utilisé en thérapie génique est qu'il ne présente aucune capacité à se répliquer. Plusieurs solutions ont été proposées pour rendre le virus Semliki défectif pour la réplication.

15

La première solution consiste à déléter les gènes de structure de l'ARN de Semliki au profit du transgène, le transgène étant placé sous la dépendance du promoteur p26S. Un tel vecteur peut être transféré sur des cellules sous forme d'ARN ou sous forme d'ADN. Toutefois, cette solution est peu intéressante pour les applications *in vivo*, 20 dans la mesure où l'on observe une faible efficacité de transfert à l'aide de ces éléments génétiques utilisés en l'absence de particules.

Une autre solution consiste à infecter les cellules cibles avec un vecteur Semliki non pas sous forme d'ADN ou d'ARN seul, mais sous forme de particules virales 25 recombinantes. Pour ce faire, on transfecite une lignée cellulaire par au moins deux plasmides, respectivement, un plasmide portant l'ARN du vecteur Semliki dénué de gènes de structure et un second plasmide portant les gènes de structure de Semliki sous la dépendance du promoteur p26S. Au sein de la cellule sont formées des particules virales qui n'encapsident que l'ARN défectif, c'est-à-dire l'ARN de Semliki 30 portant le transgène puisque lui seul porte également une séquence d'encapsidation contenue dans la séquence de la nsP2. Même si, en théorie, ce procédé ne génère aucune particule réplicative, les évènements de recombinaison restent fréquents du

fait, notamment, du chevauchement des séquences de complémentation et du virus recombinant, et de l'abondance des ARN viraux dans le cytoplasme des cellules productrices.

5 Les documents Rolls (1, 2) décrivent un vecteur SFV dont le génome a été modifié par remplacement des gènes structuraux par le gène codant l'enveloppe VSV-G, éventuellement associé à un transgène. Les particules infectieuses ainsi obtenues sont donc constituées d'une enveloppe VSV-G et contiennent un vecteur dérivé d'alpha-virus. Cependant, le système décrit est particulièrement dangereux du fait de son aptitude à se répliquer de manière autonome. Un système équivalent est décrit dans le 10 document WO 03/072771.

Le document Lebedeva *et al.* (3) décrit la coélectroporation de cellules BHK par :

15 - un vecteur assurant les fonctions de réplication (Srep β gal : gène codant la réplicase du vecteur Semliki (SFV) et la β -galactosidase comme transgène),
- un vecteur codant les gènes structuraux : ScapSenv codant la capsid et l'enveloppe de SFV comme témoin, ou un vecteur dérivé dans lequel le gène env de SFV est remplacé par des séquences env du rétrovirus MLV (Moloney 20 murine leukemia),
et l'analyse des particules virales ainsi produites. Cependant, dans ce système, la mobilisation du vecteur SFV véhiculant le transgène, en l'occurrence celui de la β -galactosidase, est sous la dépendance de l'encapsidation de cet ARN génomique recombinant par la protéine de capsid de SFV.

25 En d'autres termes, le problème que se propose de résoudre l'invention est d'améliorer le mode de mobilisation des vecteurs dérivés d'alpha-virus, en particulier du virus de la forêt de Semliki (SFV), de manière à éviter tout risque de recombinaison au sein des lignées productrices pouvant générer des particules réplicatives.

Un autre problème que se propose de résoudre l'invention est de préparer des particules virales contenant un vecteur dérivé d'alpha-virus, dont le tropisme ne soit pas limité aux cellules cibles des virus sauvages.

- 5 Le Demandeur a réussi à produire des particules virales qui répondent simultanément aux deux objectifs ci-dessus en exprimant *en trans*, dans une lignée cellulaire, les gènes codant des éléments structuraux non issus de l'alpha-virus et le vecteur dérivé d'alpha-virus rendu défectif pour la réPLICATION.
- 10 Selon un premier mode de réalisation, les gènes codant des éléments structuraux non issus de l'alpha-virus correspondent au seul gène *ENV* du virus de la stomatite vésiculeuse codant la protéine d'enveloppe VSV-G.

L'utilisation d'une enveloppe VSV-G présente plusieurs avantages. Tout d'abord, la protéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse permet un mode d'entrée cellulaire par endocytose superposable à celui des alpha-virus. En outre, la VSV-G est une protéine très stable, susceptible d'être concentrée par ultra-centrifugation et permettant d'envisager des administrations parentérales. Par ailleurs, cette protéine confère un très large tropisme aux particules qui la contiennent, élargissant ainsi le champ d'utilisation des particules virales de l'invention à des organismes aussi différents que la drosophile et les mammifères.

Selon ce premier mode de réalisation, l'expression *en trans* est obtenue par co-transfection avantageusement effectuée en deux étapes distinctes respectivement, la transfection de la lignée par le plasmide exprimant le gène de l'enveloppe VSV-G, puis une seconde transfection par le vecteur dérivé d'alpha-virus. En pratique, la co-transfection est effectuée sur des cellules 293T.

Dans un second mode de réalisation, les gènes codant des éléments structuraux non issus de l'alpha-virus correspondent aux gènes codant les protéines structurales d'un rétrovirus.

Dans ce cas, l'expression en *trans* est obtenue par transfection d'une lignée cellulaire d'encapsidation, productrice de rétrovirus défectifs pour la réplication, par le vecteur dérivé d'alpha-virus. Ce type de lignée est bien connu de l'homme du métier, par exemple le système Phoenix®
5 (http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html). On peut utiliser en particulier des lignées d'encapsidation utilisant des gènes structuraux du MLV (murine leukemia virus).

De manière connue, ces lignées sont obtenues par transfection stable d'un premier
10 plasmide exprimant les gènes *GAG-POL* et d'un second plasmide exprimant un gène *ENV* de rétrovirus ou d'un autre virus enveloppé (4).

Toutefois, il est également envisageable de préparer les particules virales par triple transfection d'une lignée cellulaire, par exemple des cellules 293T, par introduction
15 d'un premier élément viral exprimant les gènes *GAG* et *POL* de rétrovirus, d'un second élément viral exprimant le gène *ENV* de rétrovirus et du vecteur dérivé d'alpha-virus.

Il est possible d'accentuer davantage encore le caractère défectif des séquences
20 rétrovirales transcomplémentantes par mutation, notamment délétion des séquences nucléotidiques du gène *POL* codant l'intégrase (*IN*) et la transcriptase inverse (*RT*).

Dans les deux modes de réalisation de l'invention tels que précédemment décrits, le vecteur dérivé d'alpha-virus est rendu défectif pour la réplication. Cette propriété est
25 en pratique obtenue par la délétion des gènes de structure ou leur substitution au profit du(des) transgène(s) d'intérêt dans le génome du vecteur.

Selon une autre caractéristique, le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus contient un signal permettant l'encapsidation par la particule virale, appelé séquence psi.

Selon un premier mode de réalisation, la séquence psi correspond à la séquence de packaging étendue des vecteurs MLV, obtenue par amplification selon la méthode PCR (polymerase chain reaction) du vecteur PLNCX (Clontech[®]) à partir des amorces :

5 - amorce 5': LNCX Psi 2a: 5'- GGGACCACCGACCCACCACC -3' et
 - amorce 3': LNCX Psi 2b: 5'- GATCCTCATCCTGTCTCTTG -3'.

Avantageusement, la séquence psi est réduite en taille et correspond à la séquence minimale. Cette modification est intéressante dans la mesure où la séquence psi peut 10 avoir une fonction de point d'ancrage pour l'entrée des ribosomes (IRES). La fonction IRES permet ainsi de supprimer le promoteur p26S du SFV, de sorte que la traduction du transgène est obtenue à partir de l'ARN génomique.

Paradoxalement, le Demandeur a également démontré que la présence d'un signal 15 d'encapsidation rétroviral n'était pas forcément nécessaire. En effet, la quantité d'ARN recombinants du vecteur Semliki, retrouvée dans le cytoplasme des cellules transfectées, est telle que ces derniers sont préférentiellement encapsidés dans les particules rétrovirales. Ce phénomène est accentué par l'extinction des gènes cellulaires, induite par l'expression des protéines non structurales du virus Semliki. 20 La localisation sub-cellulaire des complexes de réplication du virus SFV pourrait également jouer un rôle important (5). Dès lors, et dans un mode de réalisation préféré, le génome du vecteur est dénué de séquence psi.

Le demandeur a également montré qu'il était possible de mobiliser un vecteur 25 comme décrit précédemment, contenant une séquence rétrovirale d'encapsidation, au moyen de particules rétrovirales produites en utilisant un système de transcomplémentation basé sur les vecteurs dérivés du virus de la forêt de Semliki (11). Dans ce système, il est montré que l'on peut obtenir des titres de l'ordre de 10⁶ particules par millilitre. Il est également démontré que la présence d'un signal 30 d'encapsidation rétroviral améliore le titre des particules d'environ un log. Ces particules sont utilisées efficacement pour transduire les cellules exprimant le récepteur aux virus amphotropes (Pit 2), correspondant à l'enveloppe rétrovirale

utilisée. Cette observation a une conséquence directe sur la biosécurité des particules rétrovirales produites par le procédé de Li et Garoff (11). Dans ce cadre, il est démontré que les particules produites selon le procédé de Li et Garoff contiennent, à un titre proche de 10^6 part/ml, des génomes de vecteurs SFV recombinants exprimant 5 les séquences *GAG/POL* ou *ENV* des rétrovirus.

Le Demandeur a par ailleurs constaté que le mode de transfection généralement utilisé pour les ARN recombinants des vecteurs Semliki, à savoir l'électroporation, entraînait une souffrance cellulaire importante. Aussi, et pour permettre la 10 transfection des cellules productives par des méthodes plus douces que l'électroporation, le vecteur dérivé d'alpha-virus a été modifié pour être exprimé à partir d'un promoteur eucaryote, par exemple un promoteur CMV positionné en 5' de la séquence du vecteur.

15 Enfin, le promoteur p26S du vecteur d'alpha-virus est avantageusement muté. Le vecteur SFV 26Sm2, et dans une moindre mesure le vecteur SFV 26Sm1, n'exprime plus d'ARN sub-génomique détectable, susceptible de diminuer l'encapsidation des ARN génomiques par compétition.

20 Ainsi, une particule selon l'invention correspond à une particule virale constituée d'éléments structuraux non issus d'un alpha-virus et contenant un vecteur dérivé d'alpha-virus rendu défectif pour la réplication, par déletion ou remplacement par au moins un transgène, des gènes structuraux, les éléments structuraux de ladite particule n'étant pas codés par le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus.

25 Par ailleurs, l'invention concerne l'utilisation des particules virales selon l'invention pour infecter *in vitro* des cellules. Le Demandeur a montré que les particules ainsi produites pouvaient infecter une grande variété de cellules eucaryotes, aussi bien humaines que non humaines.

30 L'invention se rapporte également à une composition pharmaceutique comprenant les particules virales de l'invention.

De même, elle se rapporte à l'utilisation des particules virales pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer.

L'invention et les avantages qui en découlent ressortiront bien des exemples suivants.

5

La figure 1 est une représentation schématique de la structure du vecteur dérivé du virus de la forêt de Semliki (SFV).

La figure 2 montre les mutations effectuées dans le promoteur p26S. Les mutations introduites dans les mutants p26Sm1 et p26Sm2 par rapport à la séquence sauvage 10 (Wt) sont encadrées. L'acide aminé en gras indique un changement dans la séquence codante.

La figure 3 est le résultat d'un Northern-blot effectué à partir de cellules productrices, exprimant des vecteurs SFV modifiés (1:pEGFPC1; 2:p26Sm1; 3:p26Sm2; 4:SFV sans transgène), avec une sonde GFP de pEGFPC1.

15 La figure 4 montre la capacité des cellules 293T et BHK 21 à exprimer les vecteurs dérivés du SFV (p26Sm1 et p26Sm2) et mobilisés par les pseudo-particules VSV-G.

La figure 5 est le résultat d'un northern blot effectué à partir des cellules infectées par le surnageant de cellules 293 T transfectées par le plasmide pMDG et des vecteurs SFV modifiés (1:pEGFPC1; 2:p26Sm1; 3:p26Sm2), avec une sonde GFP de 20 pEGFPC1.

EXEMPLE 1 : Production de particules virales à partir de lignées cellulaires exprimant l'enveloppe VSV-G

25 **I/ METHODES**

I/ Lignées et cultures cellulaires

- 293T/17 : lignée primaire de reins embryonnaires humains (ATCC CRL-11268),
- 30 - Hela : lignée cellulaire humaine (ATCC CCL-2),
- QM7 : lignée de muscle de caille (ATCC, CRL-1962),
- LMH : lignée de foie de poulet (ATCC CRL-2117).

Les quatre lignées cellulaires ci-dessus sont cultivées dans du DMEM (Invitrogen) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (FCS) (Biowest).

- HepG2 : lignée d'hépatome humain cultivée dans du EM contenant 10 % de FCS (ATCC HB-8065),
- 5 - BHK21 : lignée de rein de bébé hamster cultivée dans du GMEM contenant 5 % de FCS et 8 % de solution liquide de tryptose phosphate (ATCC CCL-10),
- CESC : Embryon de poulet obtenu et cultivé selon la référence 26,
- Cellule High Five cultivée à 27°C dans un milieu de cellules d'insectes de 10 Grace (Grace's insect medium) (cat n° B85502 Invitrogen) contenant 10 % de FCS,
- Sp2/O : Lignée murine de lymphoplastoïdes cultivée dans du RPMI 1640 contenant 10 % de FCS (ATCC CRL1581).

15 **2/ Construction du vecteur SFV**

La structure du vecteur SFV est représentée sur la figure 1.

a/ Vecteur 26Sm1

Le promoteur interne 26S du SFV est muté par PCR à partir du vecteur pSFV1 20 (Invitrogen), lequel est dénué de gènes de structure et utilisé comme matrice en présence de deux amorces, respectivement :

- une amorce 26Sm1F contenant le site de restriction Bgl II apparaissant en gras dans la séquence suivante : 5'-ATCCTCGAAGATCTAGGG-3',
- une seconde amorce mutée 26Sm1R contenant le site de restriction Cla I apparaissant en gras dans la séquence suivante :
25 5'-CAATATCGAT TACTAGCGAACTAATCTAGGA-3'.

Des mutations silencieuses sont ensuite introduites dans le promoteur p26S pour conduire au promoteur p26Sm1 comme représenté sur la figure 2. Le produit ainsi 30 amplifié est ensuite cloné dans un plasmide pIRES2-EGFP (Invitrogen) (figure 1). Une séquence rétrovirale désignée RS, dérivée d'un virus MLV est alors insérée entre le promoteur muté 26S et la séquence IRES. Les fragments contenant la séquence

26S mutée, la séquence rétrovirale de MLV et le gène EGFP sont ensuite excisés par Bgl II et Hpa I puis clonés dans le vecteur pSFV1 entre les sites de restriction Bgl II et Sma I. Le fragment de 10,5 kpb contenant le réplicon SFV modifié est enfin cloné entre le promoteur IE CMV et le signal de polyadénylation SV40 pA dans un vecteur 5 pIRES2-EGFP dans lequel la séquence IRES GFP a été déletée.

b/ Vecteur SFV26Sm2

Le promoteur interne est muté par PCR à partir du plasmide SFV1 utilisé comme matrice en présence de deux amorces respectivement, une première amorce 26Sm1F 10 et une seconde amorce 26Sm2R contenant un site de restriction apparaissant en gras dans la séquence suivante :

5'-ATATCGATTACTAGCGAACTAATCTACGACCCCCGTAAAGGTGT-3'.

L'amorce 26Sm2R conduit aux modifications du promoteur p26S comme illustré sur 15 la figure 2. Le produit amplifié est ensuite digéré par Bgl II et Cla I et ligué dans le vecteur 26Sm1 également digéré par Bgl II et Cla I pour supprimer le fragment correspondant.

3/ Transfection de la lignée cellulaire 293T par les vecteurs SFV 26Sm1 ou 26Sm2 et le plasmide pMDG et collecte des particules virales

20 Une transfection transitoire de cellules 293T au moyen d'un kit de transfection calcium / phosphate (Invitrogen) est effectuée. Les cellules 293T sont ensemencées à raison de 8.10^5 cellules par puits sur des plaques 6 puits et incubées à 37°C pendant une nuit, avant transfection. La transfection est effectuée en deux étapes. Le premier jour, les cellules 293T sont transfectées par 5 µg d'un plasmide pMDG contenant le 25 gène codant pour l'enveloppe VSV-G, sous l'influence d'un promoteur IE CMV (6). Dans une seconde étape, le deuxième jour, les cellules sont transfectées par 5 µg des vecteurs SFV 26Sm1 ou 26Sm2. Le second milieu de transfection est laissé au contact des cellules entre 13 et 17 heures. Au jour No. 3, le milieu est retiré et remplacé par du milieu frais permettant la libération des particules infectantes. Le 30 milieu de culture contenant les particules virales est collecté 5 à 6 heures plus tard.

4 / Transfection de la lignée cellulaire BHK21 par les vecteurs SFV 26Sm1 ou 26Sm2 et les vecteurs SFV GAGPOL et SFV ENV et collecte des particules virales

Les cellules BHK 21 sont électroporées $5 \cdot 10^6$ /ml (soit $4 \cdot 10^6$ cellules), à un voltage 5 de 350 V, et une capacitance de 750 μ F. Les ARN utilisés pour l'électroporation, correspondant aux différents vecteurs (26Sm1 ou m2, SFV GAGPOL et SFV ENV), sont transcrits en utilisant 1,5 μ g d'ADN linéarisé à l'aide d'un kit Invitrogen Sp6 polymérase. Pour l'électroporation, 22 μ l du produit de transcription sont électroporés. La récolte des particules recombinantes est effectuée 14 à 16 heures 10 plus tard. Les surnageants sont filtrés et déposés sur les cellules cibles en présence de 2 μ g/mL de polybrène.

5/ Infection des lignées cellulaires par les particules virales

Le surnageant des lignées cellulaires 293T transfectées est collecté puis filtré sur 15 filtre 0,45 μ m (HA Millex[®], Millipore) puis incubé avec différentes lignées cellulaires, en présence d'un milieu frais contenant du polybrène, utilisé à raison de 5 μ g par ml (Sigma). Le contrôle de l'expression de la GFP dans les cellules infectées est effectué au moyen d'un microscope IX50 Olympus à fluorescence. La quantification de la transfection est effectuée au moyen d'un cytomètre de flux 20 FACScalibur[®] de Becton Dickinson. Pour les tests contrôles, les surnageants sont utilisés dans différents réactifs :

- 10 μ g par ml de RNase A (Sigma),
- 1 μ g par millilitre d'actinomycine D (Sigma),
- 100 unités par millilitre de DNase I (Invitrogen),
- 25 - 1 mg par millilitre de généticine (Sigma), et
- 3 μ g par millilitre de puromycine (Cayla).

6/ Concentration des particules virales

Le surnageant des cellules 293 transfectées est centrifugé à 150 000 g dans un rotor SW41 pendant une heure à 4°C. Les virus concentrés sont remis en suspension dans 300 µl de PBS et 25 µl de la solution sont utilisés pour infecter 5.10⁵ cellules (293T, 5 BHK-21, Hela, HepG2, Sp2/O, LMH, QM7).

7/ Northern Blot

L'ARN des 10⁶ cellules transfectées ou infectées est extrait au moyen d'un système d'isolation d'ARN total (Promega[®]). L'ARN de cellules 293T non transfectées est 10 extrait en tant que contrôle. 2 µg de chaque ARN est soumis à une électrophorèse sur un gel dénaturant, formaldéhyde, et l'ARN est transféré sur une membrane nylon chargée positivement (Hybond-XL ; Amersham). L'hybridation du Northern Blot est effectuée selon les procédures standard. Les sondes correspondent à un fragment de 790 bp Age I-BamH I GFP du plasmide pEGFPC1 (Clontech), le fragment étant 15 marqué (Rediprime[®] II DNA labelling system ; Amersham) et purifié sur colonne (ProbeQuant[®] G-50 Micro Columns ; Amersham) avant utilisation.

II/ RESULTATS

20 1/ Fonctionnalité des vecteurs

Les vecteurs SFV 26Sm1 et 26Sm2 correspondent à des vecteurs SFV, dont le promoteur 26S a été muté dans le but d'éviter une éventuelle compétition entre l'empaquetage de l'ARN génomique du SFV et l'ARN sub-génomique produit par transcription sous l'influence du promoteur 26S. La fonctionnalité des deux vecteurs 25 a été contrôlée par transfection de cellules 293T. L'expression intense de la GFP observée suggère que la transcription et la traduction du vecteur SFV modifié sont correctes. Ce premier résultat est ensuite confirmé par analyse sur Northern Blot à partir de l'ARN extrait des cellules 293 transfectées par le vecteur SFV 26Sm1.

30 Comme le montre la figure 3, ligne 2, la sonde GFP révèle l'existence de deux bandes correspondant à de l'ARN génomique et de l'ARN sub-génomique, ce dernier suggérant que le promoteur 26S est encore fonctionnel.

Le même test est réalisé sur le second vecteur SFV 26Sm2 comportant des mutations supplémentaires. La détection de la GFP et l'analyse par Northern Blot confirment que les mutations apportées dans le promoteur 26Sm2 inhibent la production par 5 transcription, de l'ARN sub-génomique (voir figure 3, ligne 3).

2/ Production de particules virales

Des cellules 293T sont co-transfектées par le plasmide pMDG, puis le vecteur SFV 26Sm1 ou SFV 26Sm2 comme indiqué précédemment. Le surnageant des cellules 10 transfectées est transféré sur des cellules fraîches 293T ou des cellules BHK 21. La forte et rapide expression de la GFP obtenue montre qu'il est possible de mobiliser des vecteurs SFV au moyen de cellules exprimant l'enveloppe VSV-G (figure 4).

3/ Capacité des particules virales obtenues à infecter les lignées cellulaires

15 BHK21, 293T et QM7

Les résultats sont reportés dans le tableau ci-après.

Les titres viraux sont détectés 24 heures après infection par analyse FACS. Le pourcentage de cellules exprimant la GFP, rapporté au nombre de cellules au jour de l'infection, permet de calculer un titre de particules recombinantes (IP/ml).

20

Lignées cellulaires	Titre viral 26Sm1 (IP/ml)	Titre viral 26Sm2 (IP/ml)	Particules 26Sm2 concentrées (IP/ml)
BHK21	1.1×10^6	0.9×10^6	10^7
293T	1.5×10^5	1.5×10^5	5×10^6
QM7	3×10^5	3×10^5	ND

Tableau 1

Comme le montre ce tableau, le titre le plus élevé est obtenu avec les cellules BHK21 comparées aux cellules 293T et QM7.

25

4/ L'expression de la GFP contenant les cellules cibles est due à une véritable transduction par les particules virales SFV

Pour s'assurer que l'expression de la GFP est due à l'expression des vecteurs SFV et non à la mobilisation de plasmides issus de la transfection initiale ou d'une pseudo-transduction de GFP libre, les contrôles suivants sont effectués.

Tout d'abord, l'ARN de SFV est détecté par Northern Blot à partir d'ARN extrait des cellules infectées (voir figure 5). Comme pour les cellules productrices, on observe dans les cellules infectées par le vecteur SFV 26Sm1, à la fois de l'ARN génomique et de l'ARN sub-génomique. Au contraire, dans les cellules infectées avec le vecteur SFV 26Sm2, seul l'ARN génomique est détecté. L'intensité du signal suggère une réplication intense des vecteurs SFV. Cependant, pour s'assurer que la forte expression de la GFP dans les cellules cibles correspond bien à la mobilisation de l'ARN de SFV, et donc que les plasmides ont bien été transférés dans les cellules cibles, en l'espèce les cellules 293T, de la DNase I à haute concentration (1000 UI/ml) est ajoutée au surnageant de transduction. Les titres en particules virales SFV sont similaires aux titres obtenus en l'absence de DNase I, ce qui suggère une transduction plus qu'une seconde transfection. Toutefois, un tel résultat pourrait être obtenu dans l'hypothèse où le plasmide serait encapsulé dans les cellules transfectées après son entrée et délivrées ensuite dans la cellule transduite. Pour contrôler ce phénomène éventuel, les cellules cibles sont pré-traitées avec de l'actinomycine D à raison d'un microgramme par millilitre, puis incubées avec le surnageant infectieux. L'actinomycine D inhibe l'expression des gènes contrôlée par la RNA POL II, comme le génome du vecteur SFV dans le plasmide pSFV26Sm1 ou m2, mais n'a aucune action sur la réplique des SFV. Une expression similaire de la GFP est observée en présence ou en l'absence d'actinomycine D, ce qui confirme que c'est bien un ARN qui est transféré (voir tableau 2).

On vérifie ensuite si l'expression de la GFP est bien due à l'expression des vecteurs SFV ou à une pseudo-transduction dans les cellules cibles. En effet, certaines publications (7) ont montré que la GFP pouvait être transférée passivement par l'intermédiaire de particules rétrovirales indépendamment de toute expression. Pour

s'assurer du contraire, les cellules cibles sont pré-traitées par deux inhibiteurs de traduction, respectivement la génétidine et la puromycine. Après traitement, les cellules cibles montrent une expression de la GFP à peine détectable ce qui montre que la GFP observée résulte d'une traduction et non d'un transfert passif (tableau 2).

5 En outre, la co-transfection d'un plasmide pEGFPC1 exprimant fortement la GFP avec un plasmide codant pour la VSV-G ne conduit à aucune pseudo-transduction de la GFP. De la même manière, les surnageants provenant des cellules transfectées avec des vecteurs SFV seuls n'induisent pas l'expression de la GFP, ce qui prouve que la VSV-G doit être présente pour promouvoir la formation des pseudoparticules.

10 Pour confirmer que l'ARN de SFV est protégé dans les vésicules VSV-G, les surnageants sont traités avec de la RNase A, avant transduction. Il apparaît que le traitement par la RNase A n'a pas d'effet sur les titres infectieux confirmant que l'ARN de SFV est véritablement protégé (tableau 2). Au vu de l'ensemble de ces résultats, on déduit que l'expression de la GFP dans les cellules cibles est due à une

15 véritable transduction par les particules virales SFV.

	Non traité	Actinomycine D	DNase I	RNase I	Génétidine	Puromycine
Titre viral BHK 21 (IP/ml)	5×10^5	7.5×10^5	7×10^5	N.D.	N.D.	N.D.
Titre viral 293T (IP/ml)	3×10^4	N.D.	3×10^4	2×10^4	9×10^3	0

Tableau 2

EXEMPLE 2 :

20

I/ METHODES**I/ Constructions :**

Les constructions décrites dans l'exemple 1 ont été utilisées.

25 Deux autres constructions dérivées, présentant une substitution du promoteur CMV par le promoteur procaryote SP6, ont également été utilisées :

- La première construction, spSFV26Sm1, est directement dérivée de SFV26Sm1.
- La deuxième construction, spSFV26Sm1Ψ, est obtenue par digestion Bgl II-Sma I d'un plasmide pSFV1 (Invitrogen®), au sein duquel est cloné un fragment Bgl II- Hpa I du plasmide pIRES2 GFP (Clontech®), modifié par introduction d'un fragment PCR contenant l'extrémité 3' du gène nsp4 et généré en utilisant les amorces 26Sm1F et 26Sm1R (cf. exemple 1, section 2a).

5 Ces constructions sont transcrives *in vitro* puis les ARN sont introduits par électroporation dans les cellules productrices. La transcription *in vitro* est réalisée après linéarisation des plasmides par coupure BstB I. La transcription est réalisée en présence d'analogue de coiffe (Invitrogen®), de polymérase SP6 (Invitrogen®) et de ribonucléotides (Promega®).

10 15 **2/ Cellules :**

Les cellules productrices de rétrovirus recombinants, dérivées de cellules 293, phoenix® (http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html), sont cultivées en milieu DMEM (GIBCO) en présence de sérum de veau fœtal décomplémenté (Abcys).

20 Les cellules productrices sont transfectées à l'aide des plasmides SFV26Sm1 ou 26Sm2, à raison de 4 µg d'ADN pour 5.10^5 cellules, dans un puit de plaque six puits. La transfection est réalisée en utilisant le phosphate de calcium (Calcium Phosphate transfection kit, Invitrogen®).

25 Pour les deux constructions exprimant les vecteurs SFV sous forme d'ARN, la transfection est réalisée par électroporation: 40 µl de répliques produits *in vitro* sont mis en présence de 40.10^5 cellules et électroporés en utilisant le système Easyject Plus (Equibio®).

30 20 heures après la transfection, quelle que soit la méthode de transfection utilisée, le milieu est changé. 16 heures après ce changement, le milieu est récolté pour réaliser les infections. Lors de la récolte, le milieu est filtré à l'aide de filtres 0,45 µm (Millipore®).

3/ Infections:

Les surnageants filtrés sont utilisés pour infecter des cellules 293T, mises en culture dans des plaques 12 puits. L'infection est réalisée en présence d'un polycation nécessaire aux interactions virus/cellules, le polybrène (Sigma[®]) à 5 µg/ml. Le jour 5 de l'infection, un puit de cellules cibles 293T est trypsinisé pour comptage.

24 heures après l'infection, les cellules sont trypsinisées pour un passage en cytométrie de flux (FACScalibur, Becton-Dickinson[®]). Le pourcentage de cellules exprimant la GFP, rapporté au nombre de cellules au jour de l'infection, permet de calculer un titre de particules recombinantes (IP/ml) (Tableau 3).

10

4/ Contrôles:

Des contrôles, identiques à ceux réalisés dans l'exemple 1, ont été réalisés:

- 10 µg par ml de RNase A (Sigma[®]),
- 1 µg par millilitre d'actinomycine D (Sigma[®]),

15

- 100 unités par millilitre de DNase I (Invitrogen[®]),
- 1 mg par millilitre de généticine (Sigma[®]).

II/ RÉSULTATS

20

1/ Infections :

Les résultats des infections sont rapportés dans le Tableau 3.

IP/ml: particules infectieuses par ml; NR: non réalisé.

Plasmides	Aucun traitement	Rnase A	Dnase I	Actinomycine D	Généticine
SFV 26Sm1	9. 10 ³ IP/ml	7. 10 ³ IP/ml	5. 10 ³ IP/ml	4,5. 10 ³ IP/ml	< 10 ² IP/ml
SFV 26Sm2	8.10 ³ IP/ml	6. 10 ³ IP/ml	4,5.10 ³ IP/ml	4,7. 10 ³ IP/ml	< 10 ² IP/ml
spSFV26Sm 1	7. 10 ³ IP/ml	5. 10 ³ IP/ml	NR	NR	NR
spSFV 26Sm1 Ψ	6. 10 ³ IP/ml	4. 10 ³ IP/ml	NR	NR	NR

Tableau 3

La présence de cellules exprimant la GFP confirme la possibilité de mobiliser les ARN recombinants SFV par le truchement d'une particule rétrovirale. Cependant, les faibles titres observés indiquent qu'il est nécessaire de contrôler la cytotoxicité du vecteur SFV pour obtenir des titres plus importants. En effet, il existe un antagonisme entre la production des ARN du SFV et la production des protéines rétrovirales. Ces dernières voient leur production diminuer lorsque la production des protéines du SFV augmente. Plusieurs mutants des SFV ont, à ce jour, été décrits et pourront être utilisés avec profit (8).

La présence ou l'absence de la séquence d'encapsidation des rétrovirus ne semble pas avoir d'influence importante sur l'efficacité de l'encapsidation. Ici, l'importante concentration intracellulaire en ARN semble avoir un rôle déterminant pour promouvoir l'encapsidation, en accord avec les observations de Muriaux *et al.* (9). L'influence de la séquence rétrovirale psi devra être réévaluée dans le contexte de vecteurs à toxicité réduite.

Par ailleurs, ces résultats semblent indiquer qu'il existe probablement une contamination des productions de rétrovirus recombinants lorsque l'on utilise un système "helper" basé sur les vecteurs SFV (10, 11). Ces contaminants sont formés de particules rétrovirales contenant soit les vecteurs SFV servant à exprimer les 5 séquences de transcomplémentation des rétrovirus, soit les vecteurs SFV comprenant la séquence du rétrovirus recombinant. Cette observation remet en cause l'utilisation de ces modes de production des vecteurs rétroviraux à des fins cliniques, contrairement aux particules virales de l'invention.

10

15

20

25

30

BIBLIOGRAPHIE

- 5 1. Rolls, M.M., Webster, P., Balba, N.H. & Rose, J.K. Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA. *Cell* 79, 497-506. (1994).
- 10 2. Rolls, M.M., Haglund, K. & Rose, J.K. Expression of additional genes in a vector derived from a minimal RNA virus. *Virology* 218, 406-411. (1996).
- 15 3. Lebedeva, I., Fujita, K., Nehrane, A. & Silver, J. Infectious particles derived from Semliki Forest Virus Vectors encoding Murine Leukemia virus envelopes. *Journal of Virology* 71(9), 7061-7067. (1997).
- 20 4. Russell SJ, Cosset FL. Modifying the host range properties of retroviral vectors. *J Gene Med* 1, 300-11. (1999).
- 25 5. Salonen A, Vasiljeva L, Merits A, Magden J, Jokitalo E, Kaariainen L. Properly folded nonstructural polyprotein directs the semliki forest virus replication complex to the endosomal compartment. *J Virol* 77, 1691-702. (2003).
- 30 6. Naldini, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of non-dividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267 (1996).
- 35 7. Liu, M.L., Winther, B.L. & Kay, M.A. Pseudotransduction of hepatocytes by using concentrated pseudotyped vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)-Moloney murine leukemia virus-derived retrovirus vectors: comparison of VSV-G and amphotropic vectors for hepatic gene transfer. *J Virol* 70, 2497-2502. (1996).
- 40 8. Lundstrom K, Abenavoli A, Malgaroli A, Ehrengruber MU. Novel semliki forest virus vectors with reduced cytotoxicity and temperature sensitivity for long-term enhancement of transgene expression. *Mol Ther* 2, 7202-9. (2003).
9. Muriaux, D., J. Mirro, et al. . RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5246-51. (2001).
10. Wahlfors JJ, Xanthopoulos KG, Morgan RA. Semliki Forest virus-mediated production of retroviral vector RNA in retroviral packaging cells. *Hum Gene Ther* 8, 2031-41. (1997)
11. Li KJ, Garoff H. Packaging of intron-containing genes into retrovirus vectors by alphavirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3650-4. (1998).

REVENDICATIONS

1/ Particule virale constituée d'éléments structuraux non issus d'un alpha-virus et
5 contenant un vecteur dérivé d'alpha-virus rendu défectif pour la réplication, par
délétion ou remplacement par au moins un transgène, des gènes structuraux
caractérisée en ce que les éléments structuraux de ladite particule ne sont pas codés
par le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus.

10 2/ Particule virale selon la revendication 1, *caractérisée* en ce que les éléments
structuraux correspondent à la protéine d'enveloppe VSV-G seule.

15 3/ Particule virale selon la revendication 1, *caractérisée* en ce que les éléments
structuraux correspondent aux protéines structurales d'un rétrovirus.

4/ Particule selon l'une des revendications 1 à 3, *caractérisée* en ce que l'alpha-virus
est un virus de la forêt de SEMLIKI.

20 5/ Particule selon l'une des revendications 1 à 4, *caractérisée* en ce que le génome du
vecteur dérivé d'alpha-virus contient la séquence de packaging étendue des vecteurs
MLV.

6/ Particule selon l'une des revendications 1 à 5, *caractérisée* en ce que le génome du
vecteur dérivé d'alpha-virus est dénué de séquence psi.

25 7/ Particule selon l'une des revendications 1 à 6, *caractérisée* en ce que le génome du
vecteur dérivé d'alpha-virus comporte un promoteur eucaryote positionné en 5'.

30 8/ Particule selon l'une des revendications 1 à 7, *caractérisée* en ce que le vecteur
dérivé d'alpha-virus contient un promoteur p26S muté.

9/ Utilisation de la particule virale objet de l'une des revendications 1 à 8 pour infecter une cellule eucaryote *in vitro*.

10/ Composition pharmaceutique comprenant la particule virale objet de l'une des 5 revendications 1 à 8.

11/ Utilisation de la particule virale objet de l'une des revendications 1 à 8 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du cancer.

10 12/ Procédé d'obtention de particules virales, constituées d'éléments structuraux non issus d'un alpha-virus et contenant un vecteur dérivé d'alpha-virus rendu défectif pour la réplication, par déletion ou remplacement par au moins un transgène, des gènes structuraux consistant :

15 - à exprimer en *trans*, dans une lignée cellulaire, les gènes codant les éléments structuraux non issus de l'alpha-virus et le vecteur dérivé d'alpha-virus,
- à récupérer les particules virales présentes dans le surnageant de la culture cellulaire.

13/ Procédé selon la revendication 12, *caractérisé* en ce que les éléments structuraux 20 correspondent à la protéine d'enveloppe VSV-G.

14/ Procédé selon la revendication 13, *caractérisé* en ce que l'expression en *trans* est obtenue par co-transfection d'une lignée cellulaire par le vecteur d'expression de l'enveloppe VSV-G et le vecteur dérivé d'alpha-virus, la co-transfection étant effectuée en deux étapes distinctes respectivement, la transfection de la lignée par le vecteur exprimant le gène de l'enveloppe VSV-G, puis une seconde transfection par le vecteur dérivé d'alpha-virus.

15/ Procédé selon la revendication 14, *caractérisé* en ce que la lignée cellulaire 30 transfectée est une lignée de cellules 293T.

16/ Procédé selon la revendication 12, *caractérisé* en ce que les éléments structuraux correspondent aux protéines structurales d'un rétrovirus.

17/ Procédé selon la revendication 16, *caractérisé* en ce que l'expression en *trans* est obtenue par transfection d'une lignée cellulaire d'encapsidation, productrice de rétrovirus défectifs pour la réplication, par le vecteur dérivé d'alpha-virus.

18/ Procédé selon la revendication 17, *caractérisé* en ce que la lignée cellulaire d'encapsidation est obtenue par transfection stable d'une lignée cellulaire par un premier élément viral exprimant les gènes *GAG* et *POL* de rétrovirus et d'un second élément viral exprimant le gène *ENV* de rétrovirus.

19/ Procédé selon la revendication 16, *caractérisé* en ce que l'expression en *trans* est obtenue par triple transfection d'une lignée cellulaire 293 T, par introduction d'un premier élément viral exprimant les gènes *GAG* et *POL* de rétrovirus, d'un second élément viral exprimant le gène *ENV* de rétrovirus et du vecteur dérivé d'alpha-virus.

20/ Procédé selon l'une des revendications 12 à 19, *caractérisé* en ce que l'alpha-virus est un virus de la forêt de SEMLIKI.

21/ Procédé selon l'une des revendications 12 à 20, *caractérisé* en ce que le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus contient la séquence de packaging étendue des vecteurs MLV.

22/ Procédé selon l'une des revendications 12 à 21, *caractérisé* en ce que le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus est dénué de séquence psi.

23/ Procédé selon l'une des revendications 12 à 22, *caractérisé* en ce que le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus comporte un promoteur eucaryote positionné en 5'.

24/ Procédé selon l'une des revendications 12 à 23, *caractérisé* en ce que le vecteur dérivé d'alpha-virus contient un promoteur p26S muté.

1/2

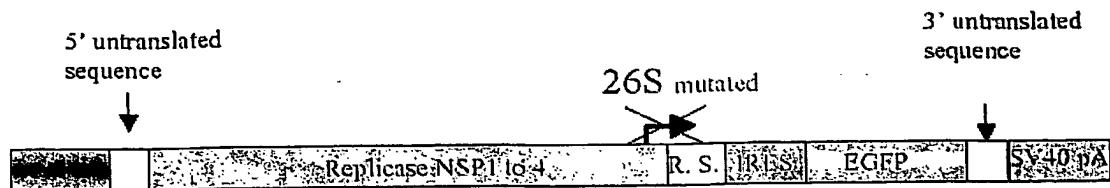


Figure 1

Wt 26S promoter	C CTC TAC GGC GGT CCT AGA TTA CTG CGT TAA
	L Y G G P R L V R STOP
26Sm1	C CTC TAC CGC GGT CCT AGA T T A G T T CG C T G C
	L Y G G P R L V R STOP
26Sm2	C C T TAC GGC GGT G T AGA TTA GTT CGC TAG
	L Y G G R R L V R STOP

Figure 2

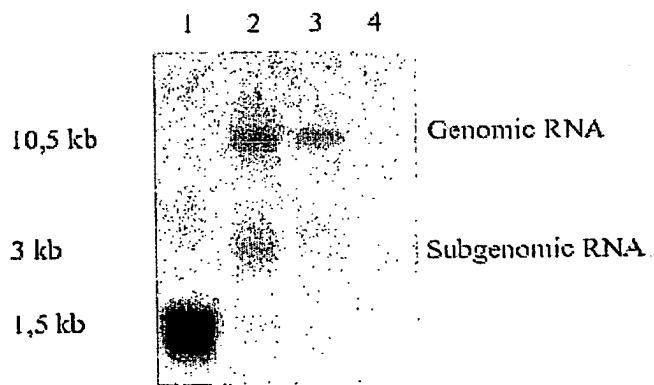


Figure 3

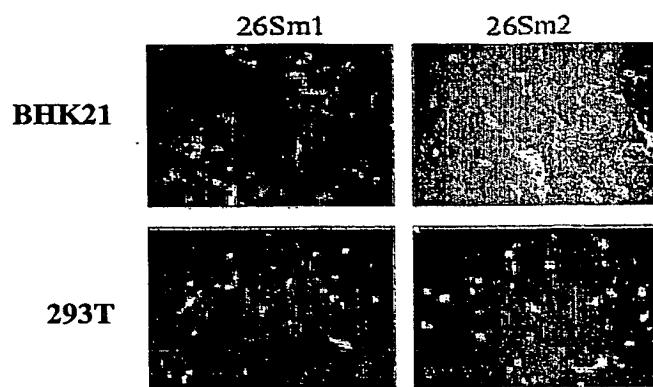
2/2

Figure 4

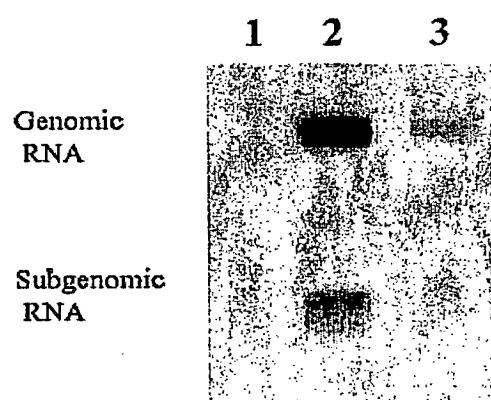


Figure 5

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS

<120> PARTICULES VIRALES CONTENANT UN VECTEUR DERIVE D'ALPHA-VIRUS
ET PROCEDE DE PREPARATION DE LADITE PARTICULE VIRALE

<130> U34-B-19925 PCT

<150> FR 03/50951
<151> 2003-12-02

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> amorce 5' LNCX Psi 2a

<400> 1
gggaccacccg acccaccacc

20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> amorce 3' LNCX Psi 2a

<400> 2
gatcctcatac ctgtctcttg

20

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> amorce 26SmlF

<400> 3
atcctcgaaatctagg

18

<210> 4
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> amorce 26SmlR

<400> 4

caatatcgat tactagcgaa ctaatctagg a

31

<210> 5
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> amorce 26Sm2R

<400> 5
atatcgattt ctagcgaact aatctacgac ccccgtaaag gtgt

44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No
PCT/FR2004/050631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/86 A61K48/00 C12N7/01 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEBEDEVA IRINA ET AL: "Infectious particles derived from Semliki forest virus vectors encoding murine leukemia virus envelopes" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 71, no. 9, 1997, pages 7061-7067, XP002284768 ISSN: 0022-538X cited in the application * page 7063, paragraphes intitulés "infectious particle formation" et "Physical properties of infectious particles" *figures 1,2	1, 3-10, 12, 15-24
Y	----- -----	2, 11, 13, 14

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 March 2005

Date of mailing of the international search report

02/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Loubradou, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intel onal Application No
PCT/FR2004/050631

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/072771 A (PASANEN TUENA ;WAHLFORS JARMO (FI)) 4 September 2003 (2003-09-04) cited in the application abstract; figure 7; examples 1-4 page 9, line 6 - line 13	2,11,13, 14
Y	LUNDSTROM KENNETH: "Alphavirus vectors as tools in cancer gene therapy." TECHNOLOGY IN CANCER RESEARCH & TREATMENT. UNITED STATES FEB 2002, vol. 1, no. 1, February 2002 (2002-02), pages 83-88, XP001182046 ISSN: 1533-0346 * page 86, paragraphe intitulé "Production of retrovirus-like particles" * abstract; figure 1	11
A	WO 98/13511 A (US HEALTH ;MORGAN RICHARD (US); WAHLFORS JARMO (US); XANTHOPOULOS) 2 April 1998 (1998-04-02) the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/050631

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 03072771	A 04-09-2003	FI 20020375 A		28-08-2003
		AU 2003206988 A1		09-09-2003
		EP 1487986 A2		22-12-2004
		WO 03072771 A2		04-09-2003
WO 9813511	A 02-04-1998	AU 4737597 A		17-04-1998
		WO 9813511 A1		02-04-1998
		US 2002173038 A1		21-11-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Derl. e Internationale No
PCT/FR2004/050631A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/86 A61K48/00 C12N7/01 A61P35/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LEBEDEVA IRINA ET AL: "Infectious particles derived from Semliki forest virus vectors encoding murine leukemia virus envelopes" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 71, no. 9, 1997, pages 7061-7067, XP002284768 ISSN: 0022-538X cité dans la demande * page 7063, paragraphes intitulés "infectious particle formation" et "Physical properties of infectious particles" *figures 1,2	1, 3-10, 12, 15-24
Y	----- -----	2, 11, 13, 14

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche Internationale a été effectivement achevée

24 mars 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche Internationale

02/05/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Loubradou, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/050631

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 03/072771 A (PASANEN TUENA ;WAHLFORS JARMO (FI)) 4 septembre 2003 (2003-09-04) cité dans la demande abrégé; figure 7; exemples 1-4 page 9, ligne 6 - ligne 13 -----	2,11,13, 14
Y	LUNDSTROM KENNETH: "Alphavirus vectors as tools in cancer gene therapy." TECHNOLOGY IN CANCER RESEARCH & TREATMENT. UNITED STATES FEB 2002, vol. 1, no. 1, février 2002 (2002-02), pages 83-88, XP001182046 ISSN: 1533-0346 * page 86, paragraphe intitulé "Production of retrovirus-like particles" * abrégé; figure 1 -----	11
A	WO 98/13511 A (US HEALTH ;MORGAN RICHARD (US); WAHLFORS JARMO (US); XANTHOPOULOS) 2 avril 1998 (1998-04-02) le document en entier -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2004/050631

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
WO 03072771	A 04-09-2003	FI 20020375 A	AU 2003206988 A1	EP 1487986 A2	WO 03072771 A2
					28-08-2003 09-09-2003 22-12-2004 04-09-2003
WO 9813511	A 02-04-1998	AU 4737597 A	WO 9813511 A1	US 2002173038 A1	17-04-1998 02-04-1998 21-11-2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.